

MASTER SET

Spécialité Sciences de la Biodiversité et Ecologie

Master 2 Proj| Parcours Valorisation de la Biodiversité et des Bio-ressources

Année 2013-2014

Rapport de stage

Résistances systémiques induites et acquises chez le bananier et l'ananas contre leurs bioagresseurs



Présenté par **Thomas DELPIERRE**

Maître de stage : Alain Soler

Tuteur universitaire : Claude PERISSOL

Stage effectué au CIRAD – Martinique

Résumé

Le priming des défenses des plantes est une solution d'avenir pour la lutte contre le phytopathogènes, méritant toute l'attention des chercheurs. La recherche effectuée par le CIRAD pour le développement de traitements et de méthodes pour utiliser cette solution sur les espèces végétales de l'agriculture locale est un premier pas encourageant en Martinique. Des plants d'ananas et de bananiers ont été traités avec différentes phytohormones et inoculés avec des nématodes phytopathogènes. Les réactions hormonales des plantes ont été mesurées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et des réactions enzymatiques ont également été mesurées par analyses enzymatiques. Les résultats ainsi obtenus sont incomplets mais prometteurs et de nouveaux résultats les compléteront bientôt.

Mots clés : défenses systémiques, GC-MS, phytohormones, priming

Induced and acquired systemic resistances in banana and pineapple plants against their bioagressors

The priming of plants natural defenses is a solution and a possible way forward in the fight against plant pathogens which deserves the attention of researchers. The research performed by CIRAD for the development of treatments and methods to use this possible solution on local agricultural plants is an encouraging first step taken in Martinique. Pineapple plants and banana plants have been treated with various plant hormones and have been infected with phytopathogenic nematodes. The plants' hormonal reaction was measured by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and enzyme reactions were also measured. The results are incomplete but promising and will soon be completed by new results.

Keywords : GC-MS, plant hormones, priming, systemic defenses

Charte anti-plagiat

Je soussigné, Thomas Delpierre, étudiant en deuxième année de master SET spécialité SBE, parcours VaBB à Aix-Marseille Université,

Atteste sur l'honneur que le présent mémoire a été écrit de mes mains, que ce travail est personnel et que toutes les sources d'informations externes et les citations d'auteurs ont été mentionnées conformément aux usages en vigueur (nom de l'auteur, nom de l'article, éditeur, lieu d'édition, année, page).

Je certifie par ailleurs que je n'ai ni contrefait, ni falsifié, ni copié l'œuvre d'autrui afin de la faire passer pour mienne.

Fait à Fort-de-France, le 25/08/2014

Signature :

Remerciements

Je remercie d'abord Mr Christian Chabrier, Directeur du Campus agro-environnemental Caraïbes, pour m'avoir permis d'effectuer ce stage au sein du Cirad,

Un grand merci également à mon maître de stage, Alain Soler, pour m'avoir proposé ce sujet de stage, pour m'avoir encadré, aidé et conseillé, et pour être resté disponible pour répondre à mes questions.

Merci à Paul-Alex Marie-Alphonsine pour son assistance à bon nombre des expérimentations, pour ses conseils et pour les excursions dans les parcelles d'ananas au nord de l'île.

Merci à Patrick Quénéhervé pour son aide, plus que bienvenue, pour la partie nématologie, et à Christiane Mauriol-Bastol pour ses conseils et petites astuces pour le comptage de nématodes.

Je remercie également les autres stagiaires : Marie, Rébecca, Florine, Illiassou, François et Audrey pour leur soutien et leur bonne humeur. Merci Audrey de m'avoir aussi aidé pour certaines des expériences au labo.

Enfin, merci à tout le personnel du Campus Agro-environnemental Caraïbe pour m'avoir accueilli chaleureusement pendant la durée de ce stage.

Table des matières

I.	Introduction	1
II.	Matériels et méthodes	4
2.1.	Matériel végétal utilisé	4
2.2.	Traitements hormonaux des vitroplants pour l'induction des défenses.....	4
2.3.	Inoculation de nématodes sur les vitroplants	7
2.3.1.	Extraction de <i>Rotylenchulus reniformis</i> par élutration	8
2.3.2.	Extraction de <i>Pratylenchus coffeae</i> par aspersion	9
2.3.3.	Comptage des nématodes et inoculation sur vitroplants	9
2.4.	<i>Phytophthora cinnamomi</i> , pathogène de l'ananas	10
2.4.1.	Isolement sur milieux sélectifs à partir de plants d'ananas contaminés	11
2.4.2.	Piégeage sur feuille d'ananas	12
2.4.3.	Piégeage sur plantule de lupin	13
2.4.4.	Piégeage sur feuille d'avocatier	14
2.4.5.	Induction de la production de sporanges et de zoospores	15
2.5.	Analyse hormonale par GC-MS	16
2.6.	Mesures d'activités enzymatiques	19
III.	Résultats	21
3.1.	Résultats de l'analyse hormonale par GC-MS	21
3.2.	Résultats des activités enzymatiques	23
3.3.	Comptage des nématodes	24
3.4.	Isolement de <i>P. cinnamomi</i> et production de zoospores	24
IV.	Discussion	25
V.	Conclusion	28
	Références Bibliographiques	29

Liste des figures

Figure 1. Représentation des molécules hormonales	5
Figure 2. Symptômes induits par <i>Phytophthora cinnamomi</i> sur un plant d'ananas	11
Figure 3. Plantules de <i>L. angustifolius</i> utilisées pour le piégeage de zoospores	14
Figure 4. Feuilles d'avocats utilisés pour le piégeage de zoospores	15
Figure 5. Chromatographe obtenu par MS/MS sur une solution utilisée pour la réalisation de courbes d'étalonnage	19
Figure 6. Mesure par GC-MS (MS/MS) de la concentration de trois hormones dans des feuilles d'ananas de la Série I. en fonction du temps suite au traitement à la laminarine sulfate.	24
Figure 7. Mesure par GC-MS (MS/MS) de la concentration de trois hormones dans des feuilles d'ananas de la Série I. en fonction du temps suite au traitement au jasmonate de méthyle	25
Figure 8. Mesure par GC-MS (MS/MS) de la concentration de trois hormones dans des feuilles d'ananas de la Série I. en fonction du temps suite au traitement à l'acide salicylique	25
Figure 9. Mesure de l'activité de la chitinase sur les échantillons d'ananas traités (Lam, MeJa et SA) en fonction du temps	26
Figure 9. Mesure de l'activité de la PAL sur les échantillons d'ananas traités (Lam, MeJa et SA) en fonction du temps	27
Figure 9. Mesure de l'activité de la LOX sur les échantillons d'ananas traités (Lam, MeJa et SA) en fonction du temps.	27

Liste des tableaux

Tableau 1. Volumes et concentrations de chaque traitement par plant.....	6
Tableau 2. Nombre de plants échantillonnés (1 feuille par plant) pour chaque horaire	7
Tableau 3. Composition des milieux sélectifs utilisés pour l'isolement de <i>P. cinnamomi</i>	12
Tableau 4. Ions fils correspondants aux phytohormones utilisées	18
Tableau 5. Nombre d'extraits enzymatiques préparés par traitement et par série d'échantillons	20

I. Introduction

La Martinique est une île des Caraïbes faisant partie des Antilles françaises. À la fois région d'outre-mer et département d'outre-mer (on parle parfois de DROM : département et région d'outre-mer), elle compte 392 300 habitants au 1^{er} janvier 2011 (INSEE 2011, [www 1](#)).

L'économie de la Martinique est essentiellement basée sur la production agricole, la pêche et l'aquaculture, le raffinage pétrolier et le tourisme. Son statut d'île, sa forte densité de population (349.4 habitants au km² contre 115 au niveau national) et son relief accidenté peuvent présenter des limites à l'extension de l'agriculture et des industries. La culture de la banane est le principal moteur de l'économie Martiniquaise : elle représente à elle seule 57.8% de la production agricole de l'île pour une surface agricole correspondant uniquement à 27% de la surface agricole utile en 2007 (Tableaux Économiques Régionaux Martinique 2010).

L'ananas quant à lui ne représente qu'une faible part de la production agricole : 1% en 2007, et la surface de la culture de l'ananas diminue d'année en année (Agreste 2013). La filière ananas était beaucoup plus importante avant les années 2000 et l'essentiel de la production était destinée à la transformation mais, depuis la fermeture de l'usine industrielle de la SOCOMOR en 2000, les producteurs ont dû se rediriger vers la distribution locale des fruits en favorisant le circuit court (vente à la ferme, sur les marchés, aux restaurants, etc.) ([www 2](#)). Les difficultés de production, la sensibilité des fruits face aux maladies et aux attaques de phytopathogènes ainsi que le coût bien plus avantageux des fruits importés (l'ananas de Saint-Domingue par exemple, accompagne la production locale pour satisfaire la demande des consommateurs) et le retrait des derniers produits phytosanitaires utilisés sur l'ananas suite aux réformes de l'UE ont grandement participé au déclin de la filière.

Aujourd'hui, la production d'ananas martiniquais ne repose plus que sur les exploitations de quelques producteurs. En termes de variétés cultivées, les plus répandues sont les variétés MD2 et Cayenne. Les variétés ananas bouteille, Queen Victoria et RL41 ne sont produites qu'à petite échelle.

L'avenir de la filière ananas en Martinique dépend en grande partie de la sélection variétale et des méthodes proposées aux producteurs afin de tendre vers une agriculture raisonnée.

Certaines de ces méthodes sont déjà mises en pratiques en champ, tant pour la culture de l'ananas que celle de la banane, et offrent déjà des résultats encourageants. L'utilisation de vitroplants, c'est-à-dire de plants sains vis-à-vis des nématodes, bactéries et champignons, la rotation des cultures avec utilisation de plantes de service en phases d'inter-culture afin d'assainir les sols des parcelles cultivées et la sélection variétale ont déjà fait leurs preuves et sont utilisées par les producteurs sur l'île (Saudubray et al. 2005).

Afin d'assurer un avenir stable et sûr à la filière ananas de Martinique, d'autres points restent cependant à approfondir pour répondre à certains problèmes. La plupart des producteurs d'ananas de Martinique doivent lutter contre la maladie de la pourriture du cœur de l'ananas, induite par l'Oomycète *Phytophthora cinnamomi* et responsable de pertes considérables dans les cultures. Le retrait des produits phytosanitaires sur ananas laisse les producteurs dans l'incapacité de lutter de façon efficace contre cette maladie et, s'ils bénéficient actuellement d'autorisations exceptionnelles pour utiliser le fongicide « Aliette Flash » de la société chimique Bayer, ce n'est qu'une solution temporaire. Des efforts de recherche se font donc pour améliorer la filière ananas martiniquaise par l'introduction de nouvelles pratiques culturales, la sélection de nouvelles variétés hybrides plus résistantes, la sélection clonale, etc.

Le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) est un établissement public à caractère industriel et commercial, placé sous la tutelle du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche ainsi que du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes.

Le CIRAD travaille en Martinique depuis plus de 50 ans sur la conception de systèmes de cultures durables et sur la recherche de solutions pour traiter les pollutions liées aux usages de pesticides par le passé (la chlordécone en particulier). Le CIRAD est associé à l'Institut de recherche pour le développement (IRD), à l'Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (Irstea) et à l'Université Antilles-Guyane pour former le Campus agro-

environnemental Caraïbes (CAEC). L'unité de recherche sur les systèmes bananes et ananas, du département Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux (Persyst) travaille sur plusieurs domaines traitant des processus biologiques afin d'étudier leurs interactions avec les conditions environnementales et les interventions techniques.

Ce stage s'insère dans la continuité d'études déjà réalisées sur l'ananas pour tenter de mettre en place des systèmes de culture d'ananas innovants en Martinique. La problématique de ce stage est de chercher à créer une méthode expérimentale pour déclencher le priming des défenses systémiques de l'ananas et du bananier afin de tester plusieurs traitements favorisant la résistance des plantes face aux phytopathogènes. Pour ce faire, une partie du stage vise à obtenir les outils nécessaires à la suite des expérimentations, et à étudier ensuite leur facilité d'utilisation au laboratoire. L'enjeu de ce stage pour l'équipe de recherche est l'élaboration d'un projet de thèse qui se baserait sur les méthodologies développées pendant ce stage pour étudier plus en profondeur les possibilités du priming sur l'ananas.

II. Matériels et Méthodes

2.1. Matériel végétal utilisé

Deux espèces végétales ont été choisies pour cette étude : l'ananas et le bananier. Le bananier (*Musa sp.*) a été choisi en raison de son importance sur l'île de la Martinique. De nombreux enjeux reposent sur la banane, qui est la principale culture de l'île. L'ananas (*Ananas comosus*) a été choisi car les problèmes qui touchent actuellement la filière ananas martiniquaise rendent la recherche de nouvelles solutions vitale.

Un total de 50 vitroplants du cultivar 902 (*Musa* AAA, sous-groupe Cavendish) du bananier, âgés de 3 mois, ont été utilisés. Durant toute la période d'expérimentation ces plants ont été maintenus dans des conditions contrôlées en chambre de culture avec un éclairage réglé de 12 heures par jour, une température constante de 27 °C et un arrosage automatique de 1 minute tous les jours.

Un total de 40 vitroplants de la variété MD-2 de *A. comosus*, également âgés de 3 mois ont été utilisés. Ils ont été maintenus dans les mêmes conditions que les bananiers durant la période d'expérimentation. La variété MD-2 a été sélectionnée pour cette étude en raison de son importance en tant que culture de la filière ananas martiniquaise et de sa sensibilité face au pathogène *Phytophthora cinnamomi*.

2.2. Traitements hormonaux des vitroplants pour l'induction des défenses

Pour chaque espèce, 3 traitements hormonaux différents ont été pratiqués avant l'inoculation de phytopathogènes pour chercher à induire le « priming » des défenses naturelles. Les traitements testés sont :

- **La laminarine sulfate (LAM)**, homologue de la laminarine, substance extraite des algues brunes laminaires (qui lui donnent son nom) et déjà étudiée et utilisée dans l'élicitation des défenses systémiques végétales face à certains pathogènes (Soler et al. 2013)

- **Le jasmonate de méthyle** (en anglais methyl jasmonate, **MeJa**), dérivé de l'acide jasmonique. Ces deux hormones végétales sont naturellement produites par les plantes pour répondre à une large gamme de stress biotiques et abiotiques.
- **L'acide salicylique (SA)**, un acide organique fonctionnant comme une phytohormone et impliqué dans la résistance systémique acquise des plantes (SAR).

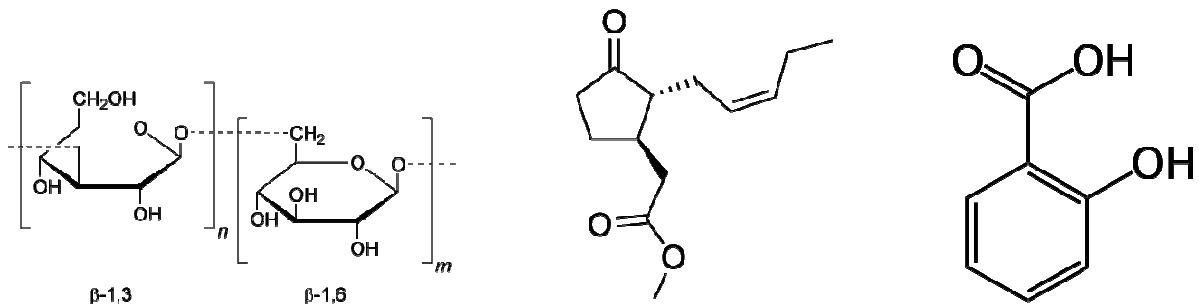


Figure 1. Représentation des molécules hormonales. De gauche à droite : la laminarine, le jasmonate de méthyle et l'acide salicylique.

Les vitroplants ont été répartis en 5 groupes pour chaque espèce afin de recevoir les différents traitements. Ces cinq groupes correspondent aux 3 traitements hormonaux et à 2 groupes témoins.

Les bananiers ont été répartis en trois groupes de 10 vitroplants pour recevoir chacun un traitement hormonal différent (LAM, MeJa et SA), un groupe de 15 vitroplants non-traités mais destiné à être inoculés avec des pathogènes (Ti, pour témoin inoculé) et un groupe de 5 vitroplants non-traités et non-inoculés (T, pour témoin).

Le nombre de vitroplants d'ananas étant moins important, les groupes composés sont moins importants que ceux des bananiers. Les plants d'ananas ont été répartis en trois groupes de 8 pour les traitements hormonaux (LAM, MeJA et SA), un groupe de 12 (Ti) et un groupe de 4 (T).

Les traitements ont été faits par injection directe de 20 ml d'hormone en solution dans le sol au pied de chaque plant, accompagnée d'une aspersion sur les feuilles. Chaque traitement a été répété à trois reprises sur l'espace d'une semaine

avec 3 jours entre chaque traitement. Les deux groupes témoins Ti et T ont reçu un volume d'eau équivalent au volume utilisé pour les traitements hormonaux.

Tableau 1. Volumes et concentrations de chaque traitement par plant.

Groupes	1^{re} traitement	2^{ème} traitement	3^{ème} traitement
LAM	20 ml (2,4 g.L ⁻¹) + aspersion	20 ml (2,4g.L ⁻¹) + aspersion	20 ml (2,4g.L ⁻¹)
MeJa	20 ml (24 µl.L ⁻¹) + aspersion	20 ml (24 µl.L ⁻¹) + aspersion	20 ml (24 µl.L ⁻¹)
SA	20 ml (138 mg.L ⁻¹) + aspersion	20 ml (138 mg.L ⁻¹) + aspersion	20 ml (138 mg.L ⁻¹)
Ti	20 ml H ₂ O + aspersion	20 ml H ₂ O + aspersion	20 ml H ₂ O
T	20 ml H ₂ O + aspersion	20 ml H ₂ O + aspersion	20 ml H ₂ O

Un jaunissement anormal des feuilles de bananiers est apparu entre le 2^{ème} et le 3^{ème} traitement, ce qui explique le retrait de l'aspersion des feuilles pour le 3^{ème} traitement des vitroplants.

Afin de pouvoir mesurer la réaction des végétaux suite aux traitements, une première série d'échantillonnage est pratiquée sur les vitroplants (**Série I.**) : des feuilles sont prélevées sur les plants des différents groupes 1H, 2H, 4H, 8H et 14H après le premier traitement. Cet échantillonnage à plusieurs horaires permet de visualiser la dynamique de la réaction des plantes suite aux traitements. Sur les bananiers, la deuxième feuille en partant du haut du plant a été prélevée. Chez les ananas, la feuille la plus grande et la plus récente à avoir atteint sa maturité a été prélevée (on parle de « feuille D »).

Tableau 2. Nombre de plants échantillonnés (1 feuille par plant) pour chaque horaire.

Groupe	1H	2H	4H	8H	14H
LAM, MeJa et SA	2 bananiers	2 bananiers	2 bananiers	2 bananiers	2 bananiers
	2 ananas	2 ananas	2 ananas	1 ananas	1 ananas
T	1 bananier	1 bananier	1 bananier	1 bananier	1 bananier
	1 ananas	1 ananas	1 ananas	1 ananas	1 ananas

Les feuilles prélevées ont été rincées à l'éthanol 70° et à l'eau distillée pour retirer toute trace de traitement sur leur surface. Elles ont été rapidement plongées dans de la saumure entre -15 et -10 °C pour stopper toute activité biologique. Une petite rondelle a été prélevée à l'emporte pièce sur chaque feuille. Les feuilles et les rondelles ont été conservées à -80°C puis les feuilles ont été broyées dans l'azote liquide et lyophilisées (à -60°C et 0.0034mb). Les feuilles prélevées 2 par 2 ont été broyées ensemble, formant ainsi des échantillons lyophilisés composés de 2 feuilles de bananiers ou d'ananas.

2.3. Inoculation de nématodes sur les vitroplants

Afin de déclencher un stress sur les vitroplants, des nématodes phytopathogéniques susceptibles d'infecter l'ananas et le bananier ont été choisis. Le nématode *Rotylenchulus reniformis* a été sélectionné pour infecter les plants d'ananas, qui comptent parmi ses plantes hôtes. Il s'agit d'un nématode, pseudo-endoparasite des plantes, rencontré dans toutes les régions tropicales et subtropicales du globe. Pour infecter les bananiers, le nématode *Pratylenchus coffeae* a été choisi. C'est un des principaux pathogènes du bananier ce qui explique son utilisation pour cette expérience.

Le laboratoire du CIRAD possédant des élevages de ces nématodes, il a été facile de s'en procurer. Les paragraphes suivants détaillent les méthodes utilisés pour extraire les nématodes des sols et des racines utilisés pour leur élevage, ainsi que l'inoculation sur les vitroplants, 3 jours après les derniers traitements.

*2.3.1. Extraction de *Rotylenchulus reniformis* par élutriation*

Le principe de l'élutriation est de mettre un échantillon de sol contenant des nématodes en suspension dans un dispositif appelé élutriateur, composé d'un erlenmeyer renversé en haut d'une colonne remplie d'eau. Un courant ascendant parcourant l'élutriateur permet de maintenir les particules fines et les nématodes en haut du système tout en laissant les particules les plus grossières décanter vers le fond de l'élutriateur (Merny et Luc, 1969).

Un volume de 250 cm³ de terre est mélangé et dispersé dans 1 L d'eau au dessus d'un tamis à grosse maille (environ 2 mm) afin de retenir graviers et grosses racines. Le mélange en suspension est récupéré et introduit dans un erlenmeyer de 2 litres que l'on complète ensuite à raz bord avec de l'eau du robinet.

Après agitation, l'erlenmeyer et son embout conique sont placés au dessus de la colonne d'élutriation, préalablement remplie d'eau et parcourue d'un courant ascendant de 80 ml.min⁻¹. Les particules de sols sédimentent rapidement vers le bas de la colonne tandis que les nématodes et les petits débris organiques restent en suspension dans l'erlenmeyer et le sommet de la colonne d'élutriation. Un tube au sommet de la colonne permet de récupérer dans un sceau le trop plein d'eau contenant nématodes et débris organiques.

Après 20 min le contenu de l'erlenmeyer est versé dans le sceau et l'élutriation continue alors pour 10 min supplémentaires à 50 ml.min⁻¹.

Au bout de 10 min, le contenu de la colonne (au dessus de la partie qui a sédimenté) est à son tour recueilli dans le sceau. Le contenu du sceau est alors versé au dessus d'une batterie de 4 tamis de 50 µm. Le refus de chaque tamis est récupéré dans un bécher avant d'être reversé délicatement au dessus d'un tamis à grosse maille recouvert d'une double épaisseur de tissus de cellulose. Ce tamis est ensuite posé au dessus d'un couvercle de boîte de pétri que l'on complète avec de l'eau et laissé au repos afin de récupérer les nématodes vivants dans une solution propre et limpide.

Au bout de 48 heures, l'eau contenue dans la boîte de pétri est récupérée et versée dans un tube gradué à 100, 50, 25 ml.

Le tube est laissé à décanter pendant 2 heures puis ramené à la dilution désirée (50 ou 25 ml) à l'aide d'une trompe à vide avant de procéder au comptage.

*2.3.2. Extraction de *Pratylenchus coffeae* par aspersion*

Le principe de l'aspersion est de forcer les nématodes à quitter les racines où ils se trouvent en causant un manque d'aération au niveau des racines, causé par l'humidité de l'aspersion. Le matériel végétal est posé sur un tamis, lui-même placé à l'intérieur d'un entonnoir. Un fin brouillard maintient une humidité constante et les nématodes, forcés à sortir des racines, sont entraînés par les gouttes d'eau ruisselant sur le matériel végétal. L'eau est alors récupérée dans un flacon (Merny et Luc, 1969).

Les racines infectées de *P. coffeae* sont lavées vigoureusement à l'eau du robinet pour les débarrasser de la terre adhérente. Elles sont ensuite découpées en morceaux d'environ 1 cm de longueur. Ces morceaux de racines sont ensuite placés sur un ensemble tamis, entonnoir, flacon de 500 ml dans une chambre à brouillard réglée à 1 min de brouillard pour 2 min de ressuyage.

Après 7 jours, le flacon contenant la suspension est récupéré et, après sédimentation, est ramené à un volume inférieur à 100 ml grâce à une trompe à vide pour être transféré directement dans un tube de comptage gradué à 100, 50, 25 ml.

Le tube est laissé à décanter pendant 2 heures puis ramené à la dilution désirée avant de procéder au comptage.

2.3.3. Comptage des nématodes et inoculation sur vitroplants

Les tubes de comptage sont mis à buller pour remettre en suspension les nématodes pour le comptage. Le but du comptage est d'obtenir une concentration en nématodes connue afin de pouvoir déterminer le nombre de nématodes inoculés pour chaque plant. 5 ml de la suspension de nématodes sont prélevés et versés à l'aide d'une pipette dans une cellule de comptage. Les nématodes sont alors comptés au microscope et le volume d'eau dans chacun des tubes est ajusté afin

d'obtenir une concentration de 1000 nématodes.ml⁻¹ pour *R. reniformis* et 400 nématode.ml⁻¹ pour *P. coffeae*.

Une fois le volume ajusté dans chaque tube, les suspensions sont versées au pied des plants de façon à inoculer 4000 *R. reniformis* par plant d'ananas et 400 *P. coffeae* par bananier.

Une deuxième série d'échantillonnage est pratiquée 10 jours après l'inoculation des nématodes (**Série II.**) : une feuille est prélevée sur chaque vitroplant (2^{ème} feuille pour les bananiers, « feuille D » pour les ananas). Ces feuilles sont rincées et conservées de la même façon que celles de la série I. (rinçage, saumure, prélèvement d'une rondelle, conservation à -80 °C, broyage et lyophilisation).

2.4. *Phytophthora cinnamomi*, pathogène de l'ananas

Les représentants du genre *Phytophthora* appartiennent à la classe des *Oomycètes* et sont connus pour être des phytopathogènes responsables de nombreuses maladies dans le règne végétal, en particulier chez les plantes domestiquées alimentaires et ornementales. Les espèces du genre *Phytophthora* ont le plus souvent une large gamme d'hôtes et une même espèce végétale peut être la cible de plusieurs espèces différentes de *Phytophthora*, ce qui explique que le genre *Phytophthora* soit responsable de certaines des maladies végétales les plus destructives. La famine de la pomme de terre en Europe, grave crise alimentaire des années 1840 causée par le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*), est un bon exemple illustrant l'effet destructeur que peuvent avoir ces microorganismes sur les cultures.

Phytophthora cinnamomi peut attaquer un très large spectre d'hôtes (plus de 1000 espèces) comprenant le châtaigner, le chêne, l'avocat, l'ananas, etc. (Drenth et Sendall, 2001). *Phytophthora cinnamomi* a été sélectionné pour cette étude en raison de son fort potentiel de pathogénicité chez l'ananas. Il est l'agent infectieux responsable de la maladie de la pourriture du cœur de l'ananas qui induit une décoloration et un brunissement des parties intérieures des feuilles du cœur. Ces jeunes feuilles pourrissent rapidement et se détachent alors facilement du cœur (figure 2).



Figure 2. Symptômes induits par *Phytophthora cinnamomi* sur un plant d'ananas. Un plant infecté présente une décoloration des feuilles et prend une teinte jaune ou vert pâle. La base des feuilles est nécrosée et des taches brunes apparaissent.

Le cycle de vie de *Phytophthora* inclut plusieurs étapes possibles sous forme sporale sexuée (oospores) ou asexuée (chlamydospores, sporanges, zoospores). Les zoospores ont la particularité de posséder deux flagelles qui les rendent mobiles dans l'eau, participant ainsi à la dispersion du pathogène et à l'infection. En effet, les zoospores du genre *Phytophthora* sont attirées par leurs plantes hôtes par chimiotactisme. La zoospore, une fois entrée dans sa plante hôte, va passer par une phase d'enkystement avant de germer et de causer la maladie. Dans le cas de la pourriture du cœur de l'ananas par *Phytophthora cinnamomi* par exemple, les zoospores peuvent facilement passer d'une plante contaminée à une plante saine grâce à des éclaboussures d'eau ou de boue (pendant une forte pluie ou pendant le passage d'un agriculteur entre les plants par exemple).

La mobilité des zoospores a permis la mise au point de méthodes pour isoler les espèces de *Phytophthora* par piégeage ou « baiting » (de l'anglais *to bait* : appâter) à partir de sols contaminés ou de cultures obtenues sur boîtes de pétri.

2.4.1. Isolement sur milieux sélectifs à partir de plants d'ananas contaminés

Des plants d'ananas contaminés par *P. cinnamomi* ont été prélevés sur le terrain de façon régulière, lors d'apparitions de la maladie sur plusieurs parcelles (parcelles de Demoniere et de Capron, situées au nord de l'île). Les plants choisis devaient présenter les premiers symptômes de la maladie (légère décoloration des feuilles, premières nécroses sur les jeunes feuilles du cœur, etc.). Les feuilles du

cœur présentant les symptômes typiques ont été soigneusement et minutieusement rincées et lavées en plusieurs étapes : après un rinçage à l'eau du robinet les feuilles ont été coupées et placées dans un bécher rempli d'eau et de détergeant (2-3 ml) et placées sous agitation verticale douce (150 tr.m^{-1}) pendant 15 minutes. Après un deuxième rinçage à l'eau de robinet les feuilles ont été trempées dans de l'éthanol à 70° pendant 1 minute puis rincées à l'eau distillée et placées dans de l'hypochlorite de sodium à 0,5% sous agitation à 150 tr.m^{-1} pendant 15 minutes. Ensuite, après 3 rinçages consécutifs à l'eau distillée stérile, des petits morceaux de feuilles ont été coupés autour des zones de nécroses et ont été placés sur différents milieux sélectifs MPP (milieu petit poids), PDA (potato dextrose agar) et « V8 » préparé à partir de jus de tomate et de légumes biologique (tableau 3).

Tableau 3. Composition des milieux sélectifs utilisés pour l'isolement de *P. cinnamomi*.

Milieu	MPP	MPP	MPP	Jus tomate	PDA
Date	23.05.2014	03.06.2014	03.06.2014	10.07.2014	10.07.2014
Rifampicine	20 mg/L	20 mg/L	10 mg/L	10,6 mg/L	10,6 mg/L
Ampiciline	180 mg/L	180 mg/L	180 mg/L	120 mg/L	120 mg/L
Pimaricine	500 µl/L	500 µl/L	500 µl/L	330 µl/L	330 µl/L
PCNB	100 mg/L	66 mg/L	66 mg/L	66 mg/L	66 mg/L
Benomyl	40 mg/L	20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L
Hymexazol	140 µg/L	92 µl/L	92 µl/L	66 µl/L	66 µl/L
pH	7	8	11	6,69	8

Les boîtes de Pétri ont ensuite été placées à incuber en chambre de culture à l'obscurité à $24-25^\circ\text{C}$. Les premières croissances de mycélium peuvent être observées après 24 à 48 heures.

2.4.2. Piégeage sur feuille d'ananas

Le piégeage de *P. cinnamomi* en utilisant le chimiotactisme des zoospores est utilisé depuis de nombreuses années pour déterminer le niveau d'infection de *P. cinnamomi* dans les sols de parcelles afin de déterminer la possibilité ou non d'y cultiver des ananas. La méthode qui suit est inspirée de méthodes connues depuis de nombreuses années et utilisées dans plusieurs régions du globe. Le principe de ces méthodes est de placer une partie d'une plante hôte (tige, fruit, feuille, etc.) dans de l'eau contenant une petite quantité de sol afin que les zoospores, potentiellement présents dans ce sol, se déplacent dans l'eau pour contaminer la plante (Anderson, 1951 ; Pratt et Heather, 1972 ; Pegg, 1977 ; Darvas, 1979).

Les sols utilisés dans cette méthode ont été prélevés sur le terrain, au pied de plants d'ananas atteints de *P. cinnamomi* sur les parcelles de Demoniere et de Capron. Ces sols seront également utilisés dans les autres méthodes de piégeage nécessitant des sols contaminés.

Une petite quantité (2 g) de sol préalablement tamisé (2 mm) est placée dans un tube avec 20 ml d'eau pure. Le mélange est agité puis centrifugé à 6000 g pendant 5 minutes pour supprimer tout sol en suspension. Une feuille d'ananas sain est introduite dans le tube, partie blanche vers le bas, de sorte que la feuille n'entre pas en contact avec le sol. Un petit pic planté en travers de la feuille sert de support pour maintenir celle-ci en haut du tube.

Après quelques jours, des nécroses peuvent apparaître sur la partie immergée des feuilles, témoignant d'une éventuelle infection par les zoospores de *P. cinnamomi*. De petits morceaux de feuilles sont prélevés autour des zones nécrosées et sont placés à incuber sur milieux sélectifs (MPP, PDA et « V8 ») à l'obscurité à 25°C.

2.4.3. Piégeage sur plantule de lupin

Cette méthode est très semblable à la méthode précédente à la différence près que des plantules de lupin bleu (*Lupinus angustifolius*), très sensibles à

Phytophthora cinnamomi, remplacent les feuilles d'ananas pour piéger les zoospores présentes dans le sol.

Des graines de lupin ont été stérilisées pendant 1 minute dans de l'éthanol à 70° puis rincées plusieurs fois dans de l'eau pure stérile et finalement trempées pendant 1 heure dans de l'eau stérile pour stimuler la germination. La germination est réalisée sur substrat de perlite stérilisé par autoclave, à l'obscurité et à 25 °C.

Après 2 à 3 jours, les plantules sont récupérées et placées dans des boîtes contenant 50 g de sol tamisé (2 mm) et environ 250 ml d'eau pure. Une grille en haut de la boîte permet de maintenir les plantules en surface afin qu'elles ne trempent pas dans l'eau et que leurs racines n'entrent pas en contact avec le sol (figure 3).

Dès l'apparition de nécroses sur les racines, les plantules sont rincées à l'eau pure et des petits bouts de racines sont découpés autour des nécroses. Ces morceaux de racines sont alors placés sur milieux sélectifs, à l'obscurité et à 25 °C.



Figure 3. Plantules de *L. angustifolius* utilisées pour le piégeage de zoospores. Les plantules servent d'appâts pour les zoospores mobiles, capables de migrer du sol vers l'eau pour atteindre les racines. L'apparition de petits anneaux sombres sur les racines (photo de droite) peut révéler une contamination par *P. cinnamomi*.

2.4.4. Piégeage sur feuille d'avocatier

Cette méthode est une autre variation des méthodes précédentes en utilisant cette fois des feuilles d'avocatiers (*Persea americana*) pour attirer et piéger les zoospores.

Des jeunes feuilles sont prélevées sur des avocatiers en prenant soin de ne choisir uniquement des feuilles ne présentant pas de taches ou de blessures. Après

un rinçage à l'eau de robinet, les feuilles sont trempées pendant 1 minute dans de l'éthanol à 70° puis elles sont rincées dans de l'eau pure.

Après cette étape, les feuilles sont placées à flotter individuellement dans des boîtes contenant de l'eau pure et un fond de sol contaminé par *P. cinnamomi* (figure 4). Des feuilles bien planes sont idéales pour cette méthode puisque l'espace de contact entre l'eau, l'air et la feuille est la zone ciblée par les zoospores.

L'apparition de nécroses brunes sur les feuilles est l'indication d'une possible contamination par *P. cinnamomi*. Des petits morceaux de feuille sont prélevés en périphérie de ces nécroses et, après un rinçage à l'éthanol à 70° suivi d'un rinçage à l'eau pure, les morceaux de feuille sont placés à incuber sur milieu sélectif (MPP, PDA et « V8 ») à l'obscurité et à 25°C.



Figure 4. Feuilles d'avocatiers utilisées pour le piégeage de zoospores. Les feuilles posées à plat à la surface de l'eau (gauche) servent d'appâts pour les zoospores présents dans le sol. Les nécroses brunes (milieu) peuvent révéler une contamination par *P. cinnamomi*. Des petits morceaux, prélevés en périphérie des nécroses sont ensuite mis à incuber sur milieu sélectif (droite).

2.4.5. Induction de la production de sporanges et de zoospores

Après une semaine, les cultures de mycélium obtenue sur boîtes de pétri peuvent être utilisées pour tenter d'induire la production de sporanges et la libération de zoospores, caractéristiques de *Phytophthora*.

Un petit cube de gélose et de mycélium est prélevé et placé au centre d'une petite boîte de pétri contenant 10 ml d'extrait de sol. L'extrait de sol est préparé en mélangeant 1 g de sol à 100 ml d'eau pure et en récupérant le surnageant après décantation pendant plusieurs heures. Ce surnageant, l'extrait de sol, permet au mycélium de se développer. La boîte de pétri est incubée pendant 48h à 25°C à l'obscurité. Le cube de gélose est ensuite rincé à l'eau distillée stérile et placé dans une nouvelle boîte de pétri contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Après un passage

de 30 minutes à 4 °C, la boîte de pétri est de nouveau incubée pendant 48h à 25 °C à l'obscurité.

Un petit morceau de gélose peut ensuite être prélevé pour être placé entre lame et lamelle pour une observation au microscope afin de déterminer la présence ou non de zoospores.

Si la production et la libération des zoospores ont été réalisées avec succès, un petit volume d'eau contenant les zoospores peut être utilisé pour infecter des plants d'ananas en versant quelques ml de la suspension de zoospores au cœur des plants.

Pour compléter cette méthode, de petits volumes de suspension de zoospores sont prélevés après environ 1 semaine et sont mélangés à de l'eau pure. De nouvelles feuilles d'ananas sont prélevées sur des plants sains et placées dans des flacons contenant ce mélange (1 ml d'eau pure et 200 µl d'extrait de sol) afin de tester la présence de zoospores dans le liquide. Les flacons sont ensuite placés à incuber à l'obscurité à 25 °C pendant quelques jours.

2.5. Analyse hormonale par GC-MS

Pour mesurer la réponse des vitroplants suite aux différents traitements (LAM, MeJa, SA et T), les quantités de trois hormones impliquées dans les réponses de défenses systémiques des plantes ont été mesurées dans les feuilles prélevées : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'acide abscissique (ABA). Ces trois hormones végétales sont produites naturellement par les plantes pour réguler les réponses de défense des plantes contre des stress biotiques et abiotiques (Fujita *et al.* 2006).

Ces hormones ont été quantifiées dans les feuilles des vitroplants par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (gas chromatography-mass spectrometry en anglais, ou GC-MS). Le principe de la GC-MS est d'utiliser un extrait liquide qui, une fois vaporisé sous forme gazeuse, est dissocié pour que ses différentes molécules puissent ensuite être fracturées, ionisées et détectées par le spectromètre. Il est ensuite possible de déterminer la

quantité d'une molécule précise dans l'extrait liquide en regardant la quantité d'ions fils obtenus lors de sa fragmentation.

Les extraits sont préparés à partir des rondelles de feuilles prélevées après le premier traitement (Série I.). Lorsque deux feuilles, et donc deux rondelles, ont été prélevées (voir 2.2. tableau 2), un quart de chaque rondelle est utilisé pour réaliser l'extrait. Lorsqu'une seule feuille a été prélevée, l'extrait est préparé à partir de la moitié de la rondelle disponible. Chaque extrait est ainsi préparé à partir de l'équivalent d'une demi-rondelle de feuille. Les demi-rondelles sont broyées au mortier dans 5 ml de méthanol chaud (50°C) + 2 ml pour rincer et récupérer le maximum d'extrait et de broyat dans le mortier. Après une centrifugation à 20 000 g pendant 5 minutes à température ambiante, le surnageant est récupéré et conservé à 4°C.

40 µl de chaque extrait sont versés dans de petits flacons HPLC individuels et sont séchés dans un bain marie sec à 50°C pendant 30 min. Lorsque chaque extrait est complètement sec, 25 µl de *N*-methyl-*N*-(*tert*.-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA) sont ajoutés et les flacons sont placés au bain marie à 45°C pendant 30 min. Le MTBSTFA est un agent de silylation permettant d'obtenir des dérivés volatiles à partir de molécules initialement peu volatiles. Ce sont ces molécules silylées qui vont être fracturées et leurs ions fils vont être lus par l'unité GC-MS (Birkemeyer *et al.* 2003)

Après cette étape, les extraits silylés sont placés dans l'unité GC-MS pour être injectés (1 µl injecté) et identifiés. La méthode utilisée est appelée MS/MS ou spectrométrie de masse en tandem (tandem mass spectrometry), qui consiste à répéter deux fois l'étape de spectrométrie de masse et de fragmentation des molécules et des ions. Chaque molécule fait ainsi une transition vers un ion fils (MS) qui est lui-même fragmenté en un ou plusieurs nouveaux ions fils (MS/MS). Le tableau suivant présente les ions fils que l'on cherche à observer et à quantifier pour chaque hormone.

Tableau 4. Ions fils correspondants aux phytohormones étudiées.

	MS	MS/MS
SA	309	195+235
JA	303	91+105
ABA	190	134+162

Chaque ion possède un temps de rétention différent à l'intérieur de l'unité GC-MS et apparaît donc à un endroit précis sur le chromatographe, rendant possible l'identification des ions et la mesure de l'intensité des pics correspondant (figure 5). L'aire mesurée des pics permet ensuite, à l'aide de courbes d'étalonnages préparées pour chacune des trois hormones, de définir la quantité d'hormone présente dans le volume d'extrait injecté dans l'unité GC-MS et donc la quantité d'hormone présente dans une demi-rondelle de feuille, nous permettant alors de calculer la quantité présente dans une feuille entière.

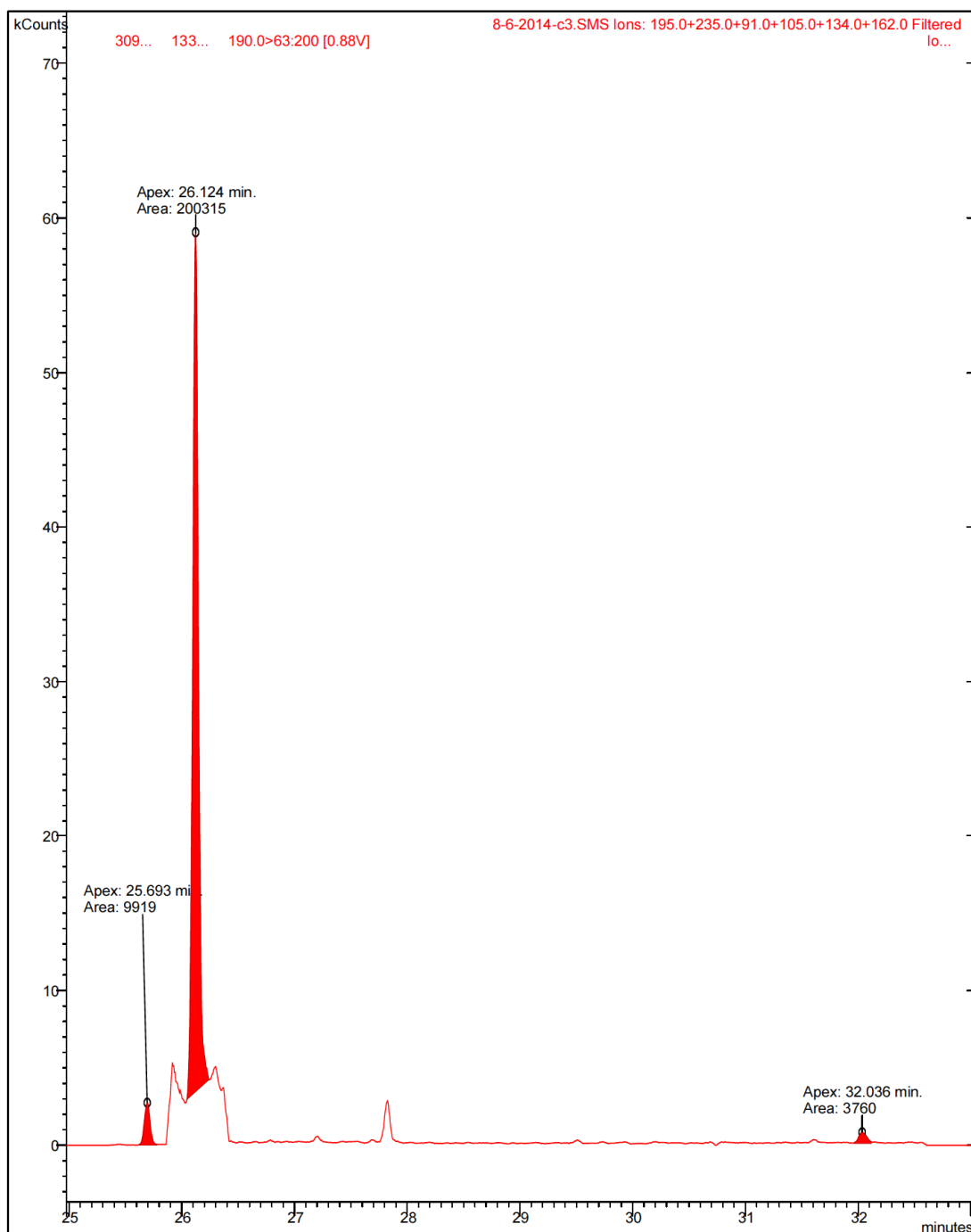


Figure 5. Chromatogramme obtenu par MS/MS sur une solution utilisée pour la réalisation de courbes d'étalonnage. Les trois pics représentent les quantités d'ions fils pour chacune des trois hormones présentes dans le volume injecté (1 μ l) et indiquent leurs temps de rétention : 25,7 min (SA), 26,1 min (JA) et 32.0 min (ABA).

2.6. Mesure d'activités enzymatiques

L'activité de 5 enzymes impliquées dans les résistances systémiques est mesurée sur les échantillons de feuilles lyophilisées de la Série I. et de la Série II.

L'analyse enzymatique des échantillons de la Série I. a pour but de mettre en évidence la dynamique de la libération des enzymes au sein de la plante en fonction du temps après les traitements. L'analyse des échantillons de la Série II. a avant tout pour but de montrer les différences entre les traitements.

Série I. : chaque échantillon lyophilisé a été utilisé individuellement pour préparer un extrait enzymatique.

Série II. : tous les échantillons lyophilisés d'un même traitement ont été mélangés pour ne former qu'un seul extrait enzymatique.

Tableau 5. Nombre d'extraits enzymatiques préparés par traitement et par série d'échantillons.

	Ananas Série I.	Ananas Série II.	Bananier Série I.	Bananier Série II.
LAM	5	1	5	1
MeJa	5	1	5	1
SA	5	1	5	1
Ti	-	1	-	1
T	5	1	5	1

Pour préparer ces extraits, 150 mg d'échantillon lyophilisé sont placés dans un pot à usage unique avec 6 ml de tampon d'extraction (tampon phosphate à 0,1 M pH 6,8 + Polyvinylpyrrolidone et tween 20) et 500 µl de PMSF à 1 mM. Les pots sont mis sous agitation pendant 1 heure dans la glace. Le contenu des pots est ensuite centrifugé à 20 000 g, à 4 °C pendant 10 min. Le surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue et filtré (0,45 µm). L'extrait enzymatique ainsi obtenu est conservé à 4 °C le temps de réaliser l'analyse enzymatique.

Les 5 enzymes utilisées sont :

- **La catalase (CAT)** est une enzyme nécessaire à la survie des organismes vivants aérobies. Elle a un rôle de protection contre le stress oxydatif par dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. Le substrat utilisé pour quantifier l'activité de la catalase est donc une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,34 M. La cinétique est mesurée avec un spectrophotomètre UV dans des cuves en Quartz.

L'activité de la catalase est mesurée pendant 4 minutes à 240 nm, par mesure de la consommation en H_2O_2 (exprimée en Kat.g^{-1} PS, $e = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

- **La lipoxgénase (LOX)** est une enzyme permettant l'oxydation de divers acides gras, notamment des lipides membranaires de certains phytopathogènes. Le substrat utilisé est l'acide linoléique à 2 mM. La mesure de la cinétique de la LOX est réalisée dans des cuves en Quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'activité de la LOX est mesurée pendant 10 minutes à 234 nm, en mesurant la production de lipides peroxydés à partir d'acide linoléique (exprimée en $\mu\text{Kat.g}^{-1}$ PS, $e = 25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

- **La phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL)** est une enzyme permettant de catalyser la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique, composé permettant entre autre la production de lignine lors de réactions de défense des plantes. Le substrat utilisé est une solution de L-phénylalanine à 60 mM. La DO est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'activité de la PAL a été mesurée à 290 nm, en mesurant la quantité d'acide cinnamique produit à partir de la L-phenylalanine (mesurée en $\mu\text{Kat.g}^{-1}$ PS, $e = 9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

- **La chitinase (CHI)** est une enzyme hydrolytique produite en réaction à l'infection de la plante par divers pathogènes. Les substrats de cette enzyme sont des constituants des parois des champignons (Lepoivre, 2003). Le substrat utilisé pour le dosage de la chitinase est une solution de N-acétylglucosamine à 2 mM. La DO est mesurée sur un spectrophotomètre dans des cuves PMMA.

L'activité de la chitinase a été mesurée à 410 nm en mesurant l'hydrolyse du substrat p-nitrophenyl N-acetylglucosamine (mesurée en nKat.g^{-1} PS, $\text{nKat} = \text{nMole p-nitrophenol s}^{-1}$).

- **La 1,3-β-Glucanase (GLU)** est une autre enzyme hydrolytique. Comme pour la chitinase, ses substrats sont des constituants des parois des champignons

(Lepoivre, 2003). Le substrat utilisé est une solution de laminarine à 4% et la DO est mesurée sur un spectrophotomètre dans des cuves PMMA.

L'activité de la GLU a été mesurée à 520 nm en mesurant l'hydrolyse de la laminarine (mesurée en mKat.g^{-1} PS, $\text{mKat} = \text{mMole glucose min}^{-1}$).

III. Résultats

La plupart des expériences étant encore en cours, lors de la rédaction de ce rapport, une partie des résultats est manquante et pourra donc être exprimée sous forme d'hypothèse appuyées des connaissances acquises lors d'expériences préliminaires pour la mise en place des protocoles.

3.1. Résultats de l'analyse hormonale par GC-MS

L'analyse hormonale a pu être réalisée à partir des échantillons d'ananas de la première série d'échantillonnage. Le passage des extraits bruts dans l'unité GC-MS a montré des variations évidentes de quantités d'hormones SA, JA et ABA en fonction du temps et du traitement utilisé sur les plants.

La figure 6 présente les résultats de l'analyse par GC-MS. Les deux premiers graphiques représentent les quantités d'hormones par gramme de feuille d'ananas (poids frais), en fonction du temps, après traitement à la laminarine sulfate. Les troisièmes et quatrièmes graphiques représentent les quantités d'hormones après traitement au jasmonate de méthyle et le dernier graphique représente quant à lui la quantité d'hormones par gramme de feuille après traitement à l'acide salicylique.

Des pics de concentrations sont visibles pour chaque hormone mais apparaissent à différents moments et à différentes intensités en fonction du traitement appliqué sur les vitroplants.

L'acide abscissique est l'hormone présente en plus grande quantité après traitement à la laminarine sulfate et au jasmonate de méthyle (respectivement 33,89 et 85,11 ng.g⁻¹ PF), au point d'écraser les courbes des deux autres hormones, d'où l'utilisation de graphiques ne montrant pas les courbes d'ABA. Il est important de noter le temps auquel apparaît chaque pic : le pic d'ABA apparaît 2 heures après traitement à la LAM, mais 4 heures après traitement au MeJa. Le traitement à l'acide salicylique n'induit apparemment pas de production ou de libération d'acide abscissique.

L'acide salicylique présente un pic de concentration au même temps que l'ABA mais est d'une intensité moindre ($3,84 \text{ ng.g}^{-1} \text{ PF}$ après traitement à LAM et $5,27 \text{ ng.g}^{-1} \text{ PF}$ après traitement au MeJA). Un pic de SA important ($23,79 \text{ ng.g}^{-1} \text{ PF}$) apparaît 4 heures après traitement à l'acide salicylique.

L'acide jasmonique est le plus régulier entre les trois traitements. Les pics de JA se situent tous 2 heures après les traitements et sont tous dans le même ordre de grandeur ($3,05$, $4,72$ et $2,38 \text{ ng.g}^{-1} \text{ PF}$ respectivement pour les traitements à la LAM, le MeJA et SA (figures 6, 7 et 8).

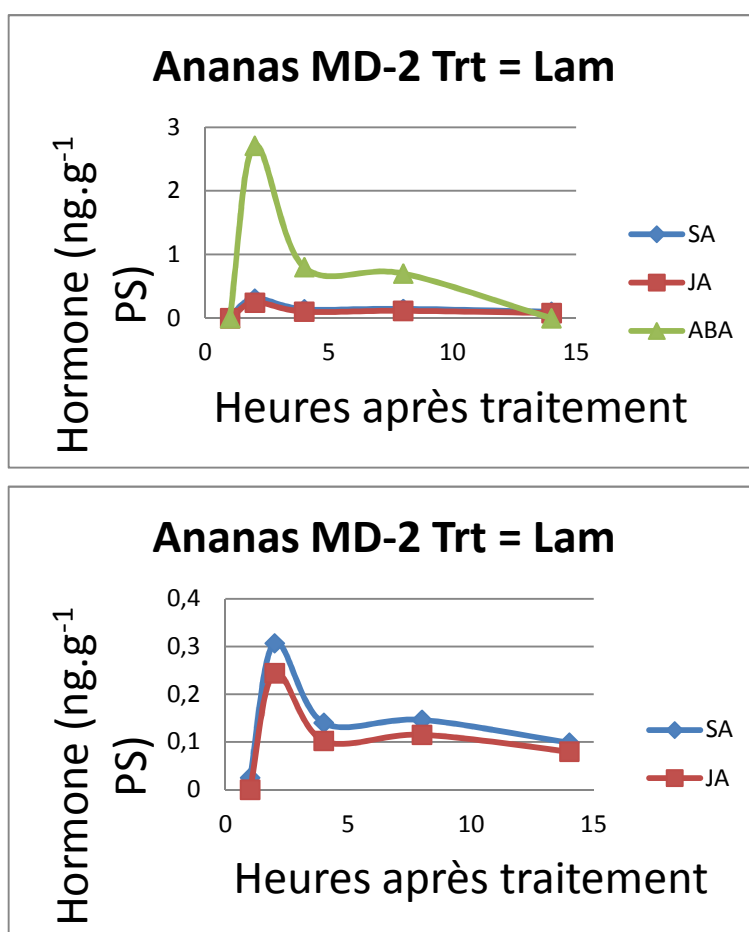


Figure 6. Mesure par GC-MS (MS/MS) de la concentration de trois hormones dans des feuilles d'ananas de la Série I. en fonction du temps suite au traitement à la laminarine sulfate.

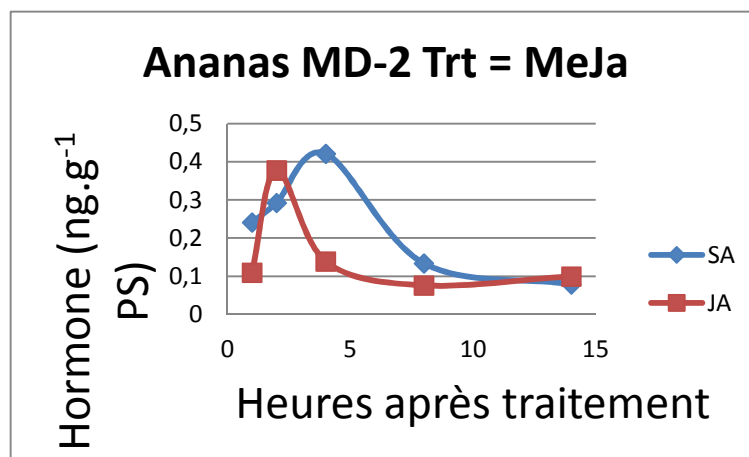
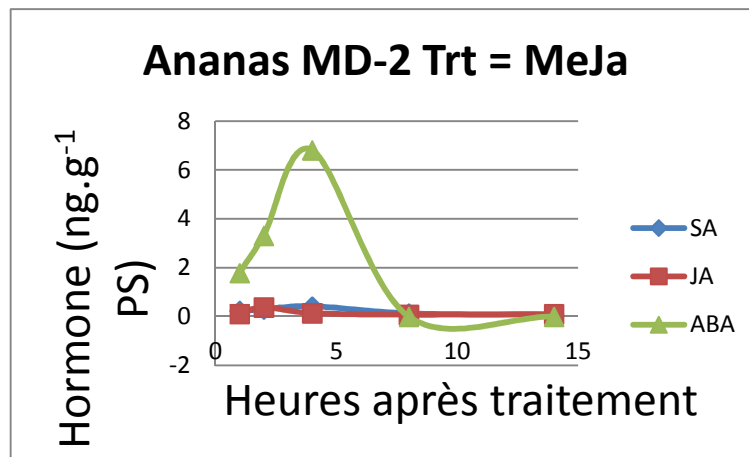


Figure 7. Mesure par GC-MS (MS/MS) de la concentration de trois hormones dans des feuilles d'ananas de la Série I. en fonction du temps suite au traitement au jasmonate de méthyle.

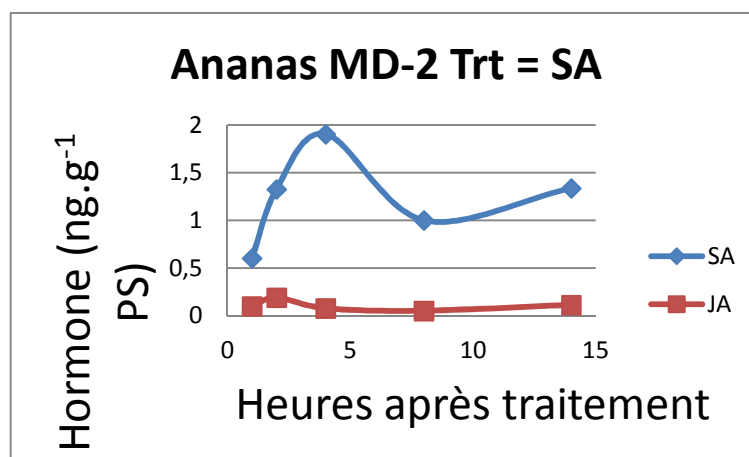


Figure 8. Mesure par GC-MS (MS/MS) de la concentration de trois hormones dans des feuilles d'ananas de la Série I. en fonction du temps suite au traitement à l'acide salicylique.

Compte tenu des résultats obtenus sur les extraits préparés à partir d'échantillons de feuilles d'ananas, il est aisé d'imaginer pouvoir observer les mêmes types de courbes sur des extraits préparés avec les échantillons de feuilles de bananiers.

3.2. Résultats des activités enzymatiques

Des résultats d'activités enzymatiques ont été obtenus sur les échantillons d'ananas de la première série d'échantillonnage pour seulement trois enzymes : la chitinase et la PAL et la LOX.

Les histogrammes représentant l'absorbance à 410 nm pour la chitinase (figure 9) indiquent l'existence de deux pics d'activité enzymatique. Le premier, 4 heures après traitement, est visible pour les extraits enzymatiques d'ananas traités au jasmonate de méthyle. Le deuxième, 8 heures après traitement, est visible pour les échantillons traités à la laminarine sulfate et à l'acide salicylique même si l'intensité du pic est très faible pour SA.

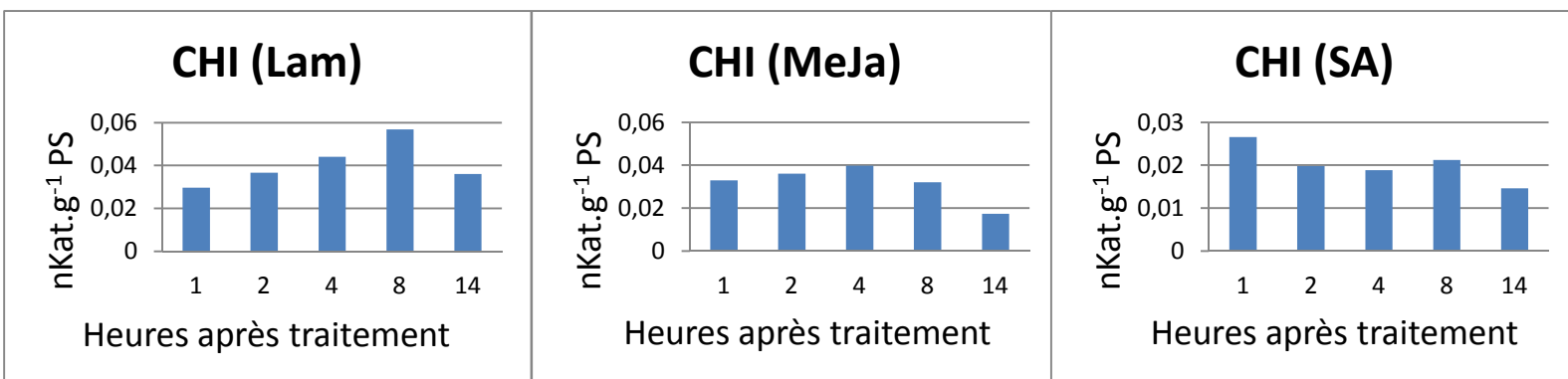


Figure 9. Mesure de l'activité de la chitinase sur les échantillons d'ananas traités (Lam, MeJa et SA) en fonction du temps.

Les mesures d'absorbance à 290 nm pour la PAL (figure 10) mettent en évidence un seul pic d'activité enzymatique visible pour tous les extraits sans distinction entre les différents traitements appliqués aux plants d'ananas. En effet, 4 heures après le traitement, l'activité enzymatique de la PAL atteint son maximum pour les trois extraits. Elle diminue ensuite (lentement pour SA) progressivement.

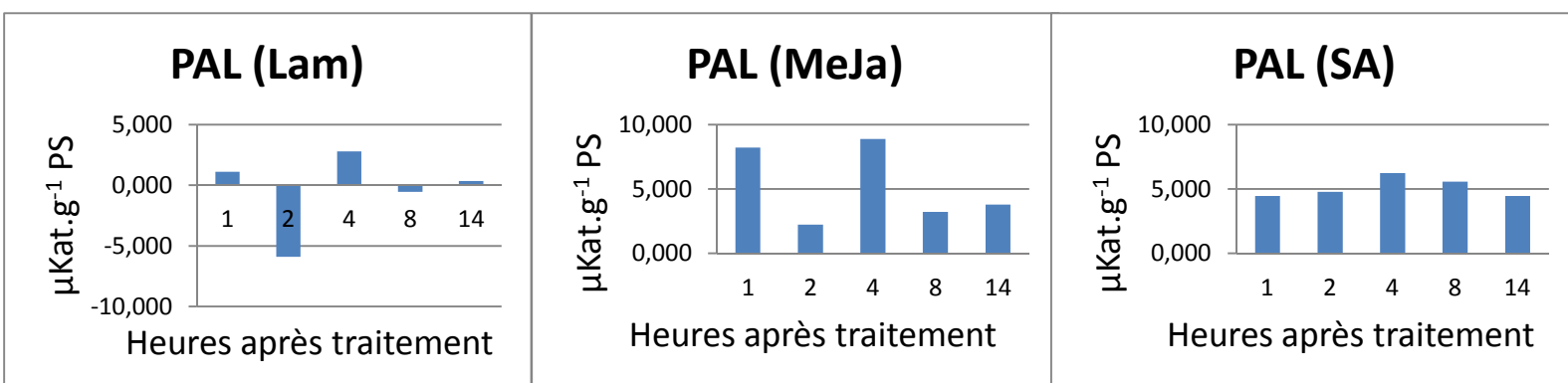


Figure 10. Mesure de l'activité de la PAL sur les échantillons d'ananas traités (Lam, MeJa et SA) en fonction du temps.

L'activité de la LOX (figure 11) n'a pu être mesurée que sur les échantillons prélevés sur les plants traités à la laminarine sulfate. L'activité enzymatique présente un pic d'intensité importante 2 heures après le traitement avant de retrouver une intensité proche de celle avant traitement.

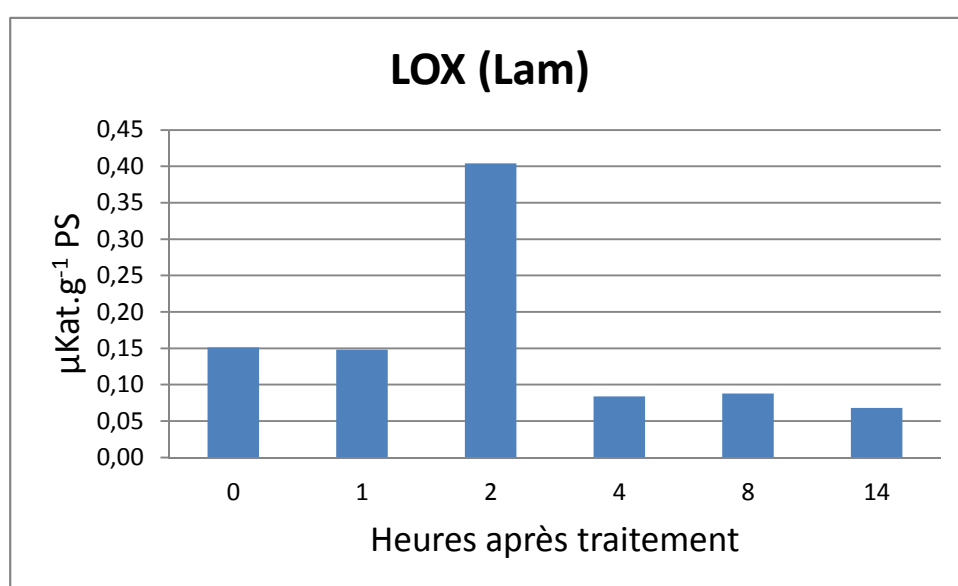


Figure 11. Mesure de l'activité de la LOX sur les échantillons d'ananas traités (Lam, MeJa et SA) en fonction du temps.

3.3. Comptage des nématodes

L'extraction des nématodes à partir des sols et des racines des vitroplants doit être effectuée 45 jours après l'inoculation, laissant ainsi aux nématodes tout le temps

nécessaire afin de se développer et de se multiplier. Le comptage des nématodes permet d'évaluer le degré d'infection des plants pour tenter de mettre en évidence un impact direct des traitements sur le développement des populations de nématodes. La durée de 45 jours n'étant pas écoulée, les nématodes n'ont pas encore pu être comptés. Il est malgré tout possible de formuler des hypothèses concernant la quantité de nématodes attendue en fonction des traitements.

Les plants d'ananas et les bananiers des groupes Ti, n'ayant reçu aucun traitement pour préparer le priming de leurs défenses systémiques, semblent être des cibles parfaites pour les populations de nématodes. On peut s'attendre à trouver les populations les plus importantes dans le substrat et les racines de ces plants.

Les plants des groupes LAM, MeJa et SA ayant reçu pour traitements des hormones impliquées dans les réponses de défense face aux stress biotiques (Fujita *et al.* 2006), il semble très probable que l'on observe des populations de nématodes moins importantes pour ces vitroplants.

3.4. Isolement de *P. cinnamomi* et production de zoospores

L'utilisation de plusieurs méthodes diverses pour tenter d'isoler *Phytophthora cinnamomi* a permis d'obtenir un nombre important de cultures sur boîtes de pétri (voir tableaux complémentaires 1 à 6, placés en annexes).

Malgré l'utilisation de plusieurs méthodes diverses pour tenter d'isoler *Phytophthora cinnamomi*, aucune des cultures obtenues sur boîte de pétri n'a permis de produire de zoospores. L'observation des mycéliums au microscope à contraste de phase montre la présence de structures de type sporange et de structures évoquant des chlamydospores sur certaines cultures, indiquant qu'il puisse s'agir d'organismes du genre *Phytophthora* mais la production de zoospores n'a pas pu être observée.

IV. Discussion

Au laboratoire, la mise en place d'une expérimentation sur le priming des défenses des plantes est un travail demandant beaucoup de temps ainsi que de nombreux outils et, si certaines étapes se sont déroulées sans trop de difficultés, d'autres parties de l'expérimentation ont rencontré un certain nombre d'obstacles.

L'application en elle-même des traitements sur les vitroplants d'ananas et de bananiers n'a pas posé de problèmes et présente des premiers résultats encourageants. Les pics d'activités hormonales obtenus par GC-MS et les premières lectures d'analyses enzymatiques sur les échantillons de feuilles d'ananas semblent aller dans la bonne direction.

En effet, l'augmentation de la concentration des phytohormones SA et JA au sein de la plante témoigne d'une réaction au traitement. Ces hormones étant impliquées dans les réponses de défenses systémiques des plantes face aux stress biotiques (Fujita *et al.* 2006, Yasuda *et al.* 2008, Martinez-Medina *et al.* 2013), leur augmentation dans les plants traités nous encourage à penser qu'elles traduiront un effet significatif sur les pathogènes de ces plants.

La réponse hormonale suite aux traitements est rapide (2 heures), intense et courte dans le temps. Elle donne suite à la réponse enzymatique qui est de toute évidence plus longue à déclencher. Il semble alors évident que la réponse enzymatique soit directement liée à la réponse hormonale et que ce soit cette dernière qui permette le déclenchement de la production d'enzymes et/ou de la libération d'enzymes inactivées et stockées par la plante en attente de l'attaque d'un phytopathogène (la deuxième possibilité étant la plus probable).

Les réponses enzymatiques déjà mesurées, bien que prometteuses, ne sont pas suffisantes pour tirer des conclusions quant à la réussite et à l'efficacité des traitements. Le reste des activités enzymatiques sera bientôt mesuré et apportera les résultats nécessaires. On peut déjà estimer que le reste des activités enzymatiques suivra le même schéma que ceux de la PAL et de la chitinase, c'est-à-dire un pic d'activité à quelques heures d'intervalle du pic de concentration en phytohormones. Seule la CAT devrait être différente et montrer, au contraire, une étape de diminution importante d'activité enzymatique après le pic de concentration d'hormones. Cela

s'explique par l'activité même de cette enzyme, qui a un rôle de détoxification de la plante lorsque. Lors de l'attaque d'un phytopathogène, la catalase est inhibée. Cela signifie que la plante subit un stress oxydatif accru mais cela est également vrai pour le phytopathogène.

Un problème rencontré pendant l'expérimentation est un manque important d'extrait enzymatique. Malgré le respect du protocole, l'extrait enzymatique préparé n'a pas été suffisant pour mesurer la totalité des enzymes, ce qui explique le manque de résultats sur les échantillons d'ananas de la Série I. La méthode devra être modifiée et adaptée, soit en diminuant les volumes d'extraits utilisés pour les analyses (en utilisant de plus petites cuves), soit en augmentant le volume de tampon d'extraction utilisé, afin d'obtenir de plus grands volumes d'extraits enzymatiques. Cela signifierait malheureusement une dilution des extraits.

L'utilisation, dans des expériences futures, de vitroplants plus âgés pourrait également être une solution. Le vitroplants utilisés pendant ce stage étant relativement plus petits et possédaient donc de petites feuilles. Les feuilles prélevées lors des séries d'échantillonnage ont à peine permis de préparer suffisamment de broyat lyophilisé pour suivre le protocole de préparation des extraits enzymatiques. Avoir de plus grandes feuilles signifierait pouvoir préparer plus de lyophilisat et donc plus d'extraits enzymatiques, sans avoir à diluer ces derniers.

L'utilisation des nématodes comme phytopathogènes pour cette étude n'était pas la meilleure option. Le temps nécessaire à leur développement et la nécessité de détruire les plants à la fin de l'expérimentation afin de procéder au comptage sont deux inconvénients majeurs qu'il aurait été important d'éviter, dans la mesure du possible.

C'est pourquoi les tentatives d'isolement de *P. cinnamomi* ont représenté une part si importante de ce stage. Le cycle de vie de *P. cinnamomi* peut être accompli en l'espace d'une à deux semaines et la récupération du phytopathogène ne demande qu'à prélever quelques feuilles sur les plants infectés. Un isolement réussi de ce pathogène aurait permis d'obtenir des résultats de façon bien plus rapide et fréquente, et aurait permis de réaliser d'avantage de répétitions afin de valider nos résultats.

Ce travail n'a pourtant pas été inutile, car la présence de structures de type sporanges sur certaines des cultures est un point encourageant et il ne reste peut être qu'à modifier certains paramètres de la phase de libération des zoospores afin d'obtenir les résultats recherchés. Les structures de type chlamydospores observées peuvent également fournir une solution : quelques mycéliums obtenus sur boîtes de pétri ont été placés dans du milieu PDA liquide, supposé encourager le développement de *Phytophthora* (Shaffer et Parke, 2012). Cet essai n'a encore donné aucun résultat mais a fourni une autre voie à explorer, avec d'autres milieux et d'autres conditions de culture (Cothier et Griffin, 1974) pour l'isolement de *P. cinnamomi*. Quelques protocoles différents doivent être testés avant la fin du stage pour tenter d'obtenir les zoospores et une germination des chlamydospores.

Conclusion

L'étude de l'efficacité du priming des défenses des plantes face à l'attaque de nématodes phytopathogènes nécessite beaucoup de temps et de ressources. Malgré tout, le priming des défenses reste un procédé innovant qui mérite d'être étudié.

Les différents aspects et les différentes réactions étudiés sur les plantes utilisées pour cette étude se complètent et permettent d'obtenir une vue globale de la réaction des plantes aux traitements. L'analyse hormonale apporte une information quant à la rapidité de la réaction au traitement. Les analyses enzymatiques à venir devraient indiquer l'intensité de la réaction, et le comptage des nématodes en fin d'expérimentation permettra de noter directement les éventuels effets des défenses des plantes et de visualiser les différences des réactions entre des plantes ayant reçu des traitements différents.

L'isolement de *Phytophthora cinnamomi*, bien qu'infructueux, est un aspect sur lequel il faudra continuer à travailler. L'obtention de *P. cinnamomi* aurait pu permettre de se passer des nématodes et des contraintes qu'ils apportent à l'expérimentation ou d'inoculer les plantes avec deux pathogènes différents pour étudier les éventuelles différences de réactions.

Références bibliographiques

Agreste Martinique : Bilan de conjoncture agricole de 2013.

Anderson E.J. 1951. A simple method for detecting the presence of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil. *Phytopathology*. **41** : 187-188.

Birkemeyer C., Kolasa A., Kopka J. 2003. Comprehensive chemical derivation for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *Journal of Chromatography A*. **933** : 89-102.

Cother E.J., and Griffin D.M. 1974. Chlamydospore germination in *Phytophthora drechsleri*. *Transactions of the British Mycological Society*. **63** : 273-279.

Darvas J.M. 1979. Lupine bait technique for the semiquantitative analysis of *Phytophthora cinnamomi* and other root pathogens in avocado soils. *South African Avocado Grower's Association Research Report*. **3** : 29-30.

Drenth A., and Sendall B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora* version 1.0. CRC for Tropical Plant Protection. Brisbane (Australia) 41 p.

Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses : a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*. **9** : 436-442.

INSEE : Tableaux économiques régionaux de Martinique 2009-2010. Chapitre 15, 134-147.

Lepoivre P. 2003. Phytopathologie. Ed. De Boeck, 427 p.

Merny G. and Luc, M. 1969. Les techniques d'échantillonnage des peuplements de nématodes dans le sol. In « Problèmes d'écologie : l'échantillonnage des peuplements animaux des milieux terrestres » Lamotte M., Bourlière F., Ed Paris : Masson et Cie, 237-272, 304 p.

- Martinez-Medina A., Fernandez I., Sanchez-Guzman M.J., Jung S.C., Pascual J.A., Pozo M.J. 2013. Deciphering the hormonal signaling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science*. **4** : article 206.
- Pegg K.G. 1977. Soil application of elemental sulphur as a control of *Phytophthora cinnamomi* root and heart rot of pineapple. *Australian Journal of Experimental Agricultural and Animal Husbandry*. **17** : 859-865.
- Pratt B.H. and Heather W.A. 1972. Method for rapid differentiation of *Phytophthora cinnamomi* from other *Phytophthora* species isolated from soil by lupin baiting. *Transactions of the British Mycological Society*. **59** : 87-96.
- Saudubray F. Horry, J-P. Marie-Alphonsine, P-A. Cros, D. Soler, A. 2005. Management de la qualité dans la filière ananas en Martinique. *Fruits*. **61** : 39-53.
- Shaffer J.P., Parke J.L. 2012. Germination of *Phytophthora ramorum* chlamydospores : a comparison of separation method and chlamydospores age. *General technical report presented at the sudden oak death fifth science symposium*. 160-163.
- Soler A., Marie-Alphonsine P-A., Corbion C., Quénehervé P. 2013. Differential response of two pineapple cultivars (*Ananas comosus* (L.) Merr.) to SAR and ISR inducers against the nematode *Rotylenchulus reniformis*. *Crop protection*. **54** : 48-54.
- Yasuda M., Ishikawa Y., Seki M., Umezawa T., Asami T., Maruyama-Nakashita A., Kudo T., Shinozaki K., Yoshida S., Nakashita H. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscissic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **20** : 1678-1692.

(www 1) http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?reg_id=23&ref_id=20679 Site de l'INSEE : population légale de Martinique en 2011 (consulté en aout 2014).

(www 2) : http://www.mairie-basse-pointe.fr/?q=culture_ananas Site de la mairie de Basse-Pointe, commune du nord de la Martinique (consulté en juillet 2014).

Annexes I.

Tableau 1. Cultures de *Phytophthora* spp. du 10/12/2013

10/12/2013	22/04/2014	05/06/2014	18/09/2014
5Ba 1 (MPP + 5Ab pH8)	=	=	=
	5Ba 1 (MPP + 3Ab + PCMB)	x	
5Ba 2 (MPP + 5Ab pH8)	=	=	=
	5Ba 2 (MPP + 3Ab + PCMB)	x	
5Ba 3 (MPP + 5Ab pH8)	=	=	x
	5Ba 3 (MPP + 3Ab + PCMB)	x	
5Ba 4 (MPP + 5Ab pH8)	=	=	=
5Ba 5 (MPP + 5Ab pH8)	=	=	=
6DC (MPP + 5Ab pH8)	=	=	=
	6DC (MPP + 3Ab + PCMB)	x	

Tableau 2. Cultures obtenues par piégeage sur feuilles ananas

16/06/2014	20/06/2014	01/07/2014
F1 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
	F1 (V8 pH 6.58)	aucune croissance
	F1 (V8 pH 7)	aucune croissance
	F1 (MPP pH 6.87)	aucune croissance
F2 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
	F2 (V8 pH 6.58)	aucune croissance
	F2 (V8 pH 7)	aucune croissance
	F2 (MPP pH 6.87)	aucune croissance
F3 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
F4 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
F5 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
F6 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
F7 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
F8 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x

Tableau 3. Cultures obtenues par piégeage sur feuilles ananas (suite)

11/07/2014	04/08/2014	18/09/2014
Feuille sur PDA pH8	=	x
Feuille sur PDA pH8	=	x
Feuille sur MPP pH11	=	x
Feuille sur MPP pH11	=	x
Feuille sur MPP pH8	=	x
Feuille sur MPP pH8	=	x
Feuille sur "V8"	=	x
Feuille sur "V8"	=	x

Tableau 4. Cultures obtenues par piégeage sur feuilles avocats

17/07/2014	18/07/2014	21/07/2014	28/07/2014	19/08/2014
A. 16, 18 et 23 (PDA pH8)	=	=	=	x
		A. 23 (PDA pH8)	=	=
			A. 23 (PDA pH8)	=
			A. 23 ("V8")	=
A. 26, 28 et 31 (PDA pH8)	=	=	=	x
	A. 13, 27 et 30 (PDA pH8)	=	=	x
A. 16, 18 et 23 (MPP pH8)	=	=	=	=
		A. 23 (MPP pH8)	A. 23 (MPP pH8)	=
		A. 23 (MPP pH11)	=	=
A. 26, 28 et 31 (MPP pH8)	=	=	=	=
	A. 13, 27 et 30 (MPP pH8)	=	=	x

Tableau 5. Cultures obtenues par piégeage sur lupin

28/05/2014	30/05/2014	04/06/2014	10/06/2014	17/06/2014	01/07/2014	18/09/2014
Eau 14 (MPP Ab PCMB)	=	=	=	=	x	
		14 (MPP 3Ab 3Fo pH7)	x			
				↓		
				14 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
Eau 16 (MPP Ab PCMB)	=	=	=	=	x	
	Eau 16 (MPP 3Ab 3Fo pH7)	=	=	=	x	
	Eau 16 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	=	=	x	
		Eau 16 (MPP 3Ab 3Fo pH7)	=	=	x	
				16 (MPP 3Ab 3Fo pH8)	=	x
		Eau 16 (MPP 3Ab PCMB pH8)	=	=	=	x
Eau 17 (MPP Ab PCMB)	=	x				
		Eau 21 A (MPP 3Ab 3Fo pH7)	x			
		Eau 21 B (MPP 3Ab 3Fo pH8)	x			
		Racine 21 A (MPP 3Ab 3Fo pH7)	x			
		Racine 21 B (MPP 3Ab 3Fo pH7)	x			

28/05/2014		30/05/2014	06/06/2014	10/06/2014	16/06/2014	01/07/2014
F1 A (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
	F1 A (MPP 3Ab 3Fo pH7)		=	=	=	=
	F1 A (MPP 3Ab 3Fo pH8)		=	=	=	X
	F1 A (MPP 3AB PCMB pH8)	x				
F1 B (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
	F1 B (MPP 3Ab 3Fo pH7)		=	=	=	X
	F1 B (MPP 3Ab 3Fo pH8)			x		
	F1 B (MPP 3AB PCMB pH8)	x				
F2 A (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
F2 B (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
F3 A (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
F3 B (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
	F3 B (MPP 3Ab 3Fo pH7)		=		x	
	F3 B (MPP 3Ab 3Fo pH8)		=	=	=	=
	F3 B (MPP 3AB PCMB pH8)	x				
F4 A (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
	F4 A (MPP 3Ab 3Fo pH7)		=		x	
	F4 A (MPP 3Ab 3Fo pH8)		=	=	=	=
	F4 A (MPP 3AB PCMB pH8)	x				
F4 B (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
F5 A (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
	F5 A (MPP 3Ab 3Fo pH7)		=		x	
	F5 A (MPP 3Ab 3Fo pH8)		=	=	=	X
	F5 A (MPP 3AB PCMB pH8)	x				
F5 B (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
F6 A (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
F6 B (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
F7 A (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
F7 B (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
	F7 B (MPP 3Ab 3Fo pH7)		=		x	
	F7 B (MPP 3Ab 3Fo pH8)		=	=	=	=
	F7 B (MPP 3AB PCMB pH8)	x				
F8 A (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
	F8 A (MPP 3Ab 3Fo pH7)			x		
	F8 A (MPP 3Ab 3Fo pH8)		=	=	=	=
	F8 A (MPP 3AB PCMB pH8)	x				
F8 B (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X
Tige (MPP + Ab + PCMB)		=	=	=	=	X

Tableau 6. Cultures obtenues sur feuilles d'ananas contaminés

21/07/2014		04/08/2014	18/09/2014
Cerco1 (oese PDA pH6)	=	=	x
Cerco2 (oese PDA pH6)	=	=	x
Cerco3 (oese PDA pH6)	=	x	
Cerco4 (coton PDA pH6)	=	=	x
	Cerco4 18>21/07 (PDA pH6)	=	x
Cerco5 (coton PDA pH6)	=	=	x
Cerco6 (coton PDA pH6)	=	=	x

Tableau 7. Tentatives d'isolement de *Mycosphaerella fijiensis* à partir de feuilles de bananiers contaminés